

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006271

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-102956
Filing date: 31 March 2004 (31.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

12.4.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 3 1 日
Date of Application:

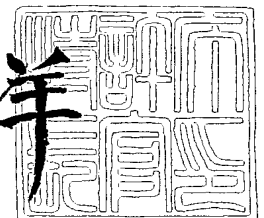
出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 1 0 2 9 5 6
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 1 0 2 9 5 6]

出 願 人
Applicant(s): 田 畑 泰 彦
 日本化薬株式会社

2 0 0 5 年 3 月 1 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特 2 0 0 5 - 3 0 2 2 9 8 0

【書類名】 特許願
【整理番号】 DA-03667
【提出日】 平成16年 3月31日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 45/00
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府宇治市琵琶台 3 - 8 - 1 6
 【氏名】 田畑 泰彦
【発明者】
 【住所又は居所】 京都府京都市左京区田中関田町 2 - 1 6 - 4 0 2
 【氏名】 山田 正敏
【発明者】
 【住所又は居所】 埼玉県さいたま市中央区上落合 6 - 1 0 - 2 1 - 1 0 1
 【氏名】 増田 亮
【特許出願人】
 【識別番号】 599029420
 【氏名又は名称】 田畑 泰彦
【特許出願人】
 【識別番号】 000004086
 【氏名又は名称】 日本化薬株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100066692
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅村 皓
【選任した代理人】
 【識別番号】 100072040
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 浅村 肇
【選任した代理人】
 【識別番号】 100088926
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 長沼 暉夫
【選任した代理人】
 【識別番号】 100102897
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 池田 幸弘
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 002901
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を結合させた水溶性フラーレン。

【請求項 2】

官能基の数が 1 - 5 個である、請求項 1 記載の水溶性フラーレン。

【請求項 3】

官能基がカルボキシル基である、請求項 1 又は 2 記載の水溶性フラーレン。

【請求項 4】

フラーレンが、C₆₀ フラーレンである、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の水溶性フラーレン。

【請求項 5】

水溶性高分子の分子量が、1, 0 0 0 ~ 1, 0 0 0, 0 0 0 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の水溶性フラーレン。

【請求項 6】

水溶性高分子が、片末端に不活性基を有し他端に反応性基を有するポリエチレングリコールである、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の水溶性フラーレン。

【請求項 7】

反応性基が、アミノ基である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の水溶性フラーレン。

【請求項 8】

分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を反応させることを特徴とする水溶性フラーレンの製造方法。

【請求項 9】

水溶性高分子がポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンのような非イオン性水溶性合成高分子；デキストラン；プルラン；デンプン、ヒドロキシエチルデンプン及びヒドロキシプロピルデンプンのようなデンプン誘導体を含む非イオン性水溶性高分子；アルギン酸；ヒアルロン酸；キトサン；キチン誘導体；及びこれらの高分子の 2 成分又は 3 成分の共重合体から選択される、請求項 8 記載の水溶性フラーレンの製造方法。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項記載の水溶性フラーレンまたは請求項 8 または 9 記載の製造方法により製造される水溶性フラーレンを含有する、活性酸素発生剤。

【請求項 11】

分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を結合させた水溶性フラーレンの凝集体。

【請求項 12】

凝集体の大きさが 2 0 ~ 4 0 0 n m である、請求項 1 1 記載の水溶性フラーレンの凝集体。

【請求項 13】

官能基の数が 1 - 5 個である、請求項 1 1 又は 1 2 記載の水溶性フラーレンの凝集体。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 請求項 7 のいずれか 1 項記載の水溶性フラーレンまたは請求項 8 または 9 記載の製造方法により製造される水溶性フラーレンを含有する、水溶液。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規水溶性フラーレン、その製造方法、活性酸素発生剤及びその凝集体

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規水溶性フラーレン、その製造方法、活性酸素発生剤及びその凝集体に関する。

【背景技術】

【0002】

一重項酸素などの活性酸素は、反応性に富み、細胞のDNAを切断し、細胞増殖を抑制し、タンパク質分解酵素の活性を阻害するなどの細胞毒性を示すことから、がん、ウイルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、糖尿病性網膜症、老人性黄斑変性症及び血管狭窄病変などの各種疾患における効果が期待されている。このような活性酸素は、各種活性酸素発生剤に可視光を照射することにより発生することが知られており、このような活性酸素発生剤としては、フラーレン、ポルフィリン誘導体などがある。

【0003】

活性酸素発生剤の一つであるフラーレンは、C_n（炭素）クラスターの総称であり、nの数に応じてC₆₀、C₇₀などの純炭素物質、又は金属（もしくは金属酸化物）を内包した炭素クラスターなどの化合物があることが知られている（非特許文献1）。フラーレン自体は、水不溶性であるため、生体内への投与が困難である。一方、がん組織には、正常組織と比べてその組織構造の違いから、高分子物質が移行しやすく、またがん組織に長く滞留する傾向がある（非特許文献2）。このため生体内への投与を可能とするように水溶性を付与するとともに、がん組織に特異的に移行し、滞留する特性を付与することによって、正常組織が活性酸素の細胞毒性を被ることによる副作用を軽減するために、各種水溶性高分子をフラーレンと結合させることが検討されている。このような水溶性高分子としては、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、デキストラン、プルラン、デンプン、及びこれらの高分子の誘導体を用いることが提案されている（非特許文献3、特許文献1）。また、フラーレンに結合する置換基の結合数が、活性酸素の生成量に大きく影響することも知られている（非特許文献4）。

【0004】

ところで、癌組織に集積した光増感剤は光照射によって反応性に富んだ一重項酸素を生成し、光照射された周辺部の癌組織のみを選択的に破壊する。このように、光増感剤と光照射とを組み合わせた癌治療を癌の光線力学的治療という。この光線力学的治療用光増感剤として、片末端にメトキシ基を有し他端にアミノ基を有する複数のポリエチレングリコールを直接結合させたフラーレンが知られている（特許文献1）。

【0005】

さらに、超音波照射に関しては、液体に超音波を照射すると、液体内部に泡が生成（cavitation）し、この生成した泡が壊れる際に、局所的に熱、圧力などが発生する。これによりラジカル（・OHなど）が発生し、このラジカルが、励起状態から基底状態に遷移したり、再結合する際に、主として300～600nmの波長範囲を有する光が出る（この現象は、ソノルミネッセンスと称される）ことが知られている（非特許文献5）。また、片末端にメトキシ基を有し他端にアミノ基を有する複数のポリエチレングリコールを直接結合させたフラーレンを含有する超音波治療用活性酸素発生剤が知られている（特許文献2）。

【特許文献1】特開平9-235235号

【特許文献2】特開2002-241307号

【非特許文献1】化学、50(6)、1995

【非特許文献2】松村ら、癌と化学療法、Vol.14, No.3, p821-829, 1987

【非特許文献3】BIO INDUSTRY, Vol.14, No.7, p30-37, 1997

【非特許文献4】Toxicology in vitro, Vol.16, p41-46, 2002

【非特許文献5】 Science, Vol.247, p1439-1445, 1990

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかし、上記のようなフラーレンはポリエチレングリコール等の水溶性高分子を複数結合したものしか得られず、また、その結合ポリエチレングリコールも一定でない。このため、水溶性高分子の結合数を制御することができず、この結合数に依存する活性酸素の生成量にバラつきが生じ、医療用としての使用を考えた場合、製品の規格化が難しい。

本発明は、水溶性高分子の結合数を制御した水溶性フラーレン（修飾分子数が制御された高分子結合水溶性フラーレン）の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、

- (1) 分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を結合させた水溶性フラーレン；
- (2) 官能基の数が1-5個である、(1)記載の水溶性フラーレン；
- (3) 官能基がカルボキシル基である、(1)又は(2)記載の水溶性フラーレン；
- (4) フラーレンが、 C_{60} フラーレンである、(1)～(3)のいずれか1項記載の水溶性フラーレン；
- (5) 水溶性高分子の分子量が、1,000～1,000,000である、(1)～(4)のいずれか1項記載の水溶性フラーレン；
- (6) 水溶性高分子が、片末端に不活性基を有し他端に反応性基を有するポリエチレングリコールである、(1)～(5)のいずれか1項記載の水溶性フラーレン；
- (7) 反応性基が、アミノ基である、(1)～(6)のいずれか1項記載の水溶性フラーレン；
- (8) 分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を反応させることを特徴とする水溶性フラーレンの製造方法；
- (9) 水溶性高分子がポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンのような非イオン性水溶性合成高分子；デキストラン；プルラン；デンプン、ヒドロキシエチルデンプン及びヒドロキシプロピルデンプンのようなデンプン誘導体を含む非イオン性水溶性高分子；アルギン酸；ヒアルロン酸；キトサン；キチン誘導体；及びこれらの高分子の2成分又は3成分の共重合体から選択される、(8)記載の水溶性フラーレンの製造方法；

【0008】

- (10) (1)～(7)のいずれか1項記載の水溶性フラーレンまたは(8)または(9)記載の製造方法により製造される水溶性フラーレンを含有する、活性酸素発生剤；
- (11) 分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を結合させた水溶性フラーレンの凝集体；
- (12) 凝集体の大きさが20～400nmである、(11)記載の水溶性フラーレンの凝集体；
- (13) 官能基の数が1-5個である、(11)又は(12)記載の水溶性フラーレンの凝集体；
- (14) 官能基がカルボキシル基である、(11)～(13)のいずれか1項記載の水溶性フラーレンの凝集体；
- (15) フラーレンが、 C_{60} フラーレンである、(11)～(14)のいずれか1項記載の水溶性フラーレンの凝集体；
- (16) 水溶性高分子の分子量が、1,000～1,000,000である、(11)～(15)のいずれか1項記載の水溶性フラーレンの凝集体；
- (17) 水溶性高分子が、片末端に不活性基を有し他端に反応性基を有するポリエチレングリコールである、(11)～(16)のいずれか1項記載の水溶性フラーレンの凝集

体;

(18) 反応性基が、アミノ基である、(11) ~ (17) のいずれか1項記載の水溶性フラーレンの凝集体;

(19) ポリエチレングリコールの分子量が、5,000~15,000である、(17) または (18) 記載の水溶性フラーレンの凝集体;

(20) (1) ~ (7) のいずれか1項記載の水溶性フラーレンまたは (8) または (9) 記載の製造方法により製造される水溶性フラーレンを含有する、水溶液; に関する。

【発明の効果】

【0009】

本発明のフラーレンに光を照射すると、220 nm ~ 可視光領域 (380 ~ 780 nm) の広い波長範囲で O_2^- が発生する。特に、260 ~ 450 nm で高い O_2^- 発生能を発揮する。従って、光照射による癌の光線力学的治療に適用できる。また、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光は、主として300 ~ 600 nm の波長範囲を有するので、超音波治療にも好適である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明のフラーレンは、分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を結合させたことを特徴とする。本発明で使用するフラーレンは、その種類で特に限定されるものではなく、活性酸素を発生するものであればいかなる種類のものも使用しうが、 $n=60$ の純炭素物質 C_{60} フラーレン、 C_{70} フラーレン、やはり純炭素物質であるナノチューブフラーレン、そして各種高次フラーレンなどを用いることができる。これらの各種フラーレンは、市販されており、例えば本荘ケミカル、三菱商事、東京化成工業などから入手することができる (商品名: C_{60} フラーレン、 C_{70} フラーレン、マルチウオールナノチューブ、シングルウォールナノチューブなど)。なかでも供給及び取り扱いの容易さの点から、 C_{60} フラーレンを用いるのが好ましい。

【0011】

フラーレンに結合している官能基としては、例えばカルボキシル基、アミノ基、水酸基、シアノ基、チオール基等があげられる。その結合数は、1~5個が好ましい。より好ましくは、分子中に1つのカルボキシル基を有するフラーレンである。この分子中に1つのカルボキシル基を有するフラーレンは、市販されており、例えば (株) サイエンスラボラトリーズ等の試薬会社から入手することができる。また、文献「テトラヘドロン・レターズ 1995年36巻38号6843頁」記載の方法にて合成することができる。

【0012】

本発明で使用する水溶性高分子としては特に限定されるものではなく、市販されている各種水溶性高分子を使用することができる。なかでも、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンのような非イオン性水溶性合成高分子; デキストラン; プルラン; デンプン、ヒドロキシエチルデンプン及びヒドロキシプロピルデンプンのようなデンプン誘導体を含む非イオン性水溶性高分子; アルギン酸; ヒアルロン酸; キトサン; キチン誘導体; 並びにこれらの高分子のアニオン性又はカチオン性誘導体、及びこれらの高分子の2成分又は3成分の共重合体を用いることができる。なかでもフラーレンと共通溶媒を持ち、フラーレンとの結合反応に関与する官能基が分子末端のみにあり、化学結合様式が単純であるなどの理由から、ポリエチレングリコールを好ましく用いることができる。

【0013】

これらの水溶性高分子の分子量は、特に限定されるものではないが、1,000~1,000,000のもの、好ましくは5,000~50,000のものを用いることができ、特に5,000~15,000のポリエチレングリコールを用いるのが好ましい。

【0014】

本発明で使用する水溶性高分子は、反応性基を有する。反応性基としては、たとえばカ

ルボキシシル基、アミノ基、水酸基、シアノ基、チオール基等があげられる。なかでもアミノ基、水酸基などの脱水縮合反応性を有する反応性基が好ましく、より好ましくはアミノ基である。このような反応性基は、フラレンとの結合に適した箇所であれば水溶性高分子の分子内のいかなる箇所に存在してもよいが、結合のしやすさを考慮して、水溶性高分子の末端に位置するのが好ましい。このような反応性基を有しない水溶性高分子を用いる場合には、フラレンとの結合の前にまず反応性基を導入しておくことが必要である。

【0015】

本発明で使用する水溶性高分子は、片末端に不活性基を有し他端に反応性基を有するものが好ましい。不活性基としては、例えばC1-C6アルキル基、C1-C6アルコキシ基、ベンジル基、その他通常保護基として使用されるものがあげられる。水溶性高分子としてポリエチレングリコールを用いる場合、C1-C6アルコキシ基が好ましい。C1-C6アルコキシ基としては、例えばメトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、n-ブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、n-ペンタオキシ基、n-ヘプタオキシ基等があげられ、入手の容易性からメトキシ基が好ましい。

【0016】

本発明のフラレンは、生体への投与が可能な程度の水溶性を有していればよい。水溶性高分子と結合したフラレンは、凝集体を形成するものが好ましく、その凝集体の粒径は、がんなどの組織への移行と集積のし易さ及び正常細胞への移行を考慮すると、20~400nm程度が好ましく、より好ましくは30~200nm程度である。このような凝集体を形成するために必要な水溶性高分子の分子量は、用いる水溶性高分子の種類及びフラレン結合する数によっても異なる。例えば1分子当たり1個のアミノ基を有するポリエチレングリコールの場合には分子量が2,000~30,000、好ましくは5,000~15,000の範囲であるのが好ましい。

【0017】

本発明の水溶性フラレンの製造方法は、分子中に官能基を有するフラレンの官能基に水溶性高分子を反応させることを特徴とする。分子中に官能基を有するフラレンを使用することにより、水溶性高分子の結合数を制御することが可能となる。例えば、分子中に1つの官能基を有するフラレンを使用すると水溶性高分子を1つ有するフラレンが得られ、分子中に2つの官能基を有するフラレンを使用すると水溶性高分子を2つ有するフラレンが得られる。例えば、分子中に1つのカルボキシシル基を有するフラレンと片末端にC1-C6アルコキシ基を有し他端に反応性基を有する水溶性高分子を縮合反応させる場合、分子中に1つのカルボキシシル基を有するフラレンと片末端にC1-C6アルコキシ基を有し他端に反応性基を有する水溶性高分子の使用割合は前者1モルに対して後者0.1~10モル程度、好ましくは前者0.5モルに対して後者2モル程度であり、より好ましくは前者1モルに対して後者1~1.1モル程度である。

【0018】

反応は、例えば縮合反応、付加反応、置換反応等の公知の化学結合を生成させる反応があげられる。縮合反応の場合は、例えば、水溶性高分子の反応性基がアミノ基の場合、通常のペプチド縮合反応によって行われる。ペプチド縮合反応の場合、フラレンに結合する官能基はカルボキシシル基であり、脱水縮合剤の存在下に行われる。当該脱水縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、1-ジメチルアミノプロピル-3-エチルカルボジイミドなどのカルボジイミド、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン化合物塩などのホスホニウム塩、ジフェニルホスホリルアジドなどが挙げられ、好ましくは、ジイソプロピルカルボジイミドである。脱水縮合剤の使用量は、フラレンのカルボキシシル基に対して0.5~10モル当量であり、好ましくは、1~2モル当量である。反応は、添加剤存在下または非存在下で行われ、当該添加剤としては、N-ヒドロキシスクシンイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、4-ニトロフェノール、ペンタフルオロフェノールなどが挙げられ、好ましくは、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールである。添加剤の使用量は、フラレンのカルボキシシル基に対して0.5~10モル当量であり、好ましくは、1

～2モル当量である。

【0019】

この反応では、有機溶媒を使用する。有機溶媒としては、反応が進行する限り特に限定されないが、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレンなどの芳香族炭化水素類、塩化メチレン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、クロロベンゼン、ブロモベンゼン、1,2-ジクロロベンゼンなどのハロゲン化炭化水素類、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ジメトキシエタン、ジエチレングリコールジメチルエーテルなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ヘキサメチルリン酸トリアミドなどのアミド類、N,N-ジメチルイミダゾリジノンなどのウレア類または上記溶媒の混合溶媒などが挙げられ、好ましくは、トルエン、クロロベンゼン、ブロモベンゼン、1,2-ジクロロベンゼン及びジオキサンとジクロロメタンの1:1混合溶媒であり、より好ましくは、ブロモベンゼンである。反応温度は、 $-20 \sim 100^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは、 $0 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは、室温 $\sim 37^{\circ}\text{C}$ であり、反応時間は、1～72時間、好ましくは、3～24時間である。本反応は、遮光下で行うのが好ましい。得られた反応生成物は、自体公知の分離手段、例えば、減圧濃縮、溶媒抽出、結晶化、クロマトグラフィー、透析、凍結乾燥などにより単離、精製することができる。

【0020】

水溶性高分子としては特に限定されるものではなく、上述したような市販されている各種水溶性高分子を使用することができる。なお上述したように、水溶性高分子は、フラーレンとの結合を可能とするように、アミノ基などの反応性基を有している必要がある。反応性基を有しない水溶性高分子を用いる場合には、フラーレンとの結合の前にまず反応性基を導入することが必要である。例えばカルボキシル基を有する水溶性高分子においては、N-ヒドロキシスクシンイミド・カルボジイミド、カルボジイミド、クロロ炭酸エチルなどを用いたカルボキシル基とアミノ化合物との間の結合反応によりアミノ基を高分子側鎖に導入する。例えばポリエチレングリコールにアミノ基を導入するには、片末端COOHを有するポリエチレングリコールをpH5.0のリン酸緩衝液(10重量%)に溶解させ、そこへ水溶性カルボジイミドをCOOHに対して3倍モル量投入し、室温で1時間攪拌することにより、カルボキシル基を活性化する。その後、エチレンジアミンをCOOHに対して10倍モル量加え、更に室温で6時間反応させる。得られた反応液を水に対して透析することにより片末端にアミノ基が導入されたポリエチレングリコールを得ることができる。また、片端にアミノ基が、もう一方の片端にメトキシ基が導入されたポリエチレングリコールは、日本油脂株式会社から入手可能である。

【0021】

本発明の活性酸素発生剤は、上記のようにして得られた水溶性高分子と結合したフラーレンを含有し、水溶液や含水溶媒の溶液として使用される。このフラーレンに光を照射すると、220～可視光領域(380～780nm)の広い波長範囲で O_2^- が発生する。特に、260～450nmで高い O_2^- 発生能を発揮する。従って、光照射による癌の光線力学的治療に適用できる。また、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光は、主として300～600nmの波長範囲を有するので、超音波治療にも好適である。

【0022】

本発明の水溶性フラーレンは、水系溶媒中では、一定の大きさの凝集体を形成する。水系溶媒としては、例えば水、水-アセトニトリル等があげられる。本発明の活性酸素発生剤は、フラーレンが水溶性高分子と結合しているため、生体に投与するのに十分な水溶性を有すると共に、一定の大きさの凝集体を形成するので、がん組織や炎症組織への高い移行性、滞留性を有すると考えられる。この凝集体は、結合する水溶性高分子の数がそろったフラーレンの凝集体で、高分子ミセル構造をとると考えられる。

【0023】

本発明の活性酸素発生剤に含まれるフラーレンは、超音波照射により惹起されたソノル

ミネッセンスによって発生する光により水性媒体中で一重項酸素などの活性酸素を発生させることにより細胞毒性を示すため、がんを含む各種疾患の治療に使用することができる。照射する超音波は、周波数約 100 KHz ~ 20 MHz、特に約 1 ~ 3 MHz のものを好ましく使用することができる。照射は、約 0.1 ~ 5 W att / cm²、なかでも約 2 W att / cm² の出力で行うのが好ましい。照射時間は、用いる周波数、照射出力によっても異なるが、約 5 ~ 300 秒、好ましくは約 30 ~ 120 秒であり、その Duty cycle は、約 1 ~ 100 %、好ましくは約 10 % である。

【0024】

本発明の活性酸素発生剤は、活性酸素が細胞毒性を示すあらゆる種類のがん、ウイルス感染症、細胞内寄生性感染症、肺線維症、肝硬変、慢性腎炎、動脈硬化、糖尿病性網膜症、老人性黄斑変性症及び血管狭窄病変などの治療に有効である。例えばがんとしては、肺がん、肝がん、膵がん、胃腸がん、膀胱がん、腎がん、脳腫瘍のような臓器の表層及びその内部に発生するあらゆる固形がんを挙げることができる。なかでも、超音波治療に使用する場合には、光照射が不可能であり従来は光線力学的治療が不可能であった身体深部のがんの治療に有効に用いることができる。その他の疾病については、その病巣又は感染細胞（罹患細胞）が臓器内部に位置しているので、活性酸素発生剤をその部位に適当な方法によって集積させた後、そこに外部より光もしくは超音波照射することによって治療を行うことができる。

【0025】

本発明の活性酸素発生剤は、注射剤（静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、皮内など）、分散剤、流動性剤、固形粉末剤などのあらゆる剤型とすることができる。例えば注射剤とする場合には、本発明の活性酸素発生剤を、注射剤に一般に用いられる緩衝剤、生理食塩水、保存剤、注射用蒸留水などの各種添加剤を配合して注射剤とすることができる。本発明の活性酸素発生剤の投与量は、投与経路、患者の年齢、性別、疾患の種類及び状態によっても異なるが、成人 1 日当たり約 1 ~ 10 mg / kg を 1 ~ 数回に分けて投与することができる。

【0026】

上述したように、がん組織や炎症組織には、正常組織と比較して高分子物質が移行しやすく、かつ蓄積しやすい。したがって、水溶性高分子と結合したフラーレンを含有する本発明の活性酸素発生剤は、生体に投与されると、正常組織に比べてがん組織や炎症組織に集積され、正常組織におけるよりも高濃度で長くがん組織や炎症組織に滞留する。一方、正常組織においてはがん組織や炎症組織におけるよりも速やかに本発明の活性酸素発生剤が排泄されるため、本活性酸素発生剤を生体に投与後、ある程度の時間をおけば、がん組織や炎症組織における本活性酸素発生剤の濃度は、正常組織における濃度よりも有意に高いものとなり、本活性酸素発生剤ががん組織や炎症組織に特異的に高濃度で分布することになる。したがって、本活性酸素発生剤を生体に投与後、ある程度の時間をおいた後に生体に光もしくは超音波を照射すれば、光もしくは超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光により活性酸素発生剤が一重項酸素などの活性酸素を発生させることによりがん組織や炎症組織において特異的に抗がん活性や抗炎症活性が示される。一方、正常組織においては、本活性酸素発生剤の濃度は低くなっているため、正常組織に対する細胞毒性はがん組織や炎症組織におけるほどは高くなく、正常組織における副作用が軽減されることが期待される。

【0027】

ヒトにおいて本発明の活性酸素発生剤の投与後、がん組織や炎症組織での活性酸素発生剤の濃度が正常組織での濃度よりも有意に高くなり、光もしくは超音波照射が可能になるまでの時間は、個々の患者の治療部位における代謝の状態、活性酸素発生剤の分布の時間変化などによって異なるが、一般的には投与の約 0.1 ~ 48 時間後、特に約 24 時間後に光もしくは超音波照射を行うのが好ましい。超音波をヒトに照射する場合には、前述したような周波数を、前述したような出力、時間で照射する。したがって、本発明の活性酸素発生剤を用いて治療を行なうには、本発明の活性酸素発生剤を、例えば注射剤の剤型で

患者に投与し、約0.1～48時間後に、光照射装置もしくは超音波発生装置を用いて照射を行なう。投与量、及び投与／照射の頻度、回数などは、患者の年齢、体重、性別、疾患の種類及び状態などに応じて決定することができる。

【0028】

本発明の活性酸素発生剤は、がん組織や炎症組織に特異的に移行、蓄積されるわけではないが、目標とする組織や細胞へ本発明の活性酸素発生剤を送達する任意の方法、例えばドラッグデリバリーシステムにより特異的に送達する方法を用いることにより、目標とする組織や細胞でその細胞毒性作用を示させることが可能である。このような方法としては、目標とする組織や細胞に本発明の活性酸素発生剤を直接注入する方法（例えば内視鏡を用いることで体内のほとんどの部位への送達が可能である）、目標とする組織や細胞に対する抗体、レクチン、細胞接着因子、糖鎖などの細胞認識因子を活性酸素発生剤に結合させた本発明の活性酸素発生剤を投与する方法などを挙げることができる。また、本発明の活性酸素発生剤を生体に投与後、活性酸素発生剤に活性酸素を発生させたい箇所のみにも光もしくは超音波照射をすることにより、所望の箇所でのみ活性酸素を発生させて細胞毒性を示させることもできる。また、光もしくは超音波をフォーカシングすることによって、細胞毒性発現部位の選択性を向上させることも可能である。

【0029】

以下に、実施例、参考例および試験例を示し、本発明を更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定するものではない。

参考例1

(1, 2-メタノ [60] フラーレン) - 61-カルボン酸 *tert*-ブチルエステル (540 mg, 0.65 mmol) をトルエン (380 mL) に溶解し、4-トルエンスルホン酸1水和物 (222 mg, 1.17 mmol) を加えて、10時間加熱還流した。析出した褐色沈殿物をろ取り、トルエン、蒸留水およびエタノールにて順次洗浄後、減圧下乾燥して、(1, 2-メタノ [60] フラーレン) - 61-カルボン酸 (338 mg, 収率67%) を褐色結晶として得た。

【0030】

FAB-MS (positive mode) : m/z 779 (M+H)⁺ ;

¹H-NMR (CDCl₃/DMSO-d₆ (1:1), ppm) : 5.15 (¹H, s).

【実施例1】

【0031】

0.33 mM (1, 2-メタノ [60] フラーレン) - 61-カルボン酸のプロモベンゼン溶液14.7 mLに等モル量の片末端メトキシ基で片末端アミノ基のポリエチレングリコール (PEG, 分子量5000, 日本油脂製) を含むプロモベンゼン溶液2 mLを加え、2倍モル量の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール及びN, N'-ジイソプロピルカルボジイミドを添加し、室温、24時間、遮光条件下で攪拌した。反応液を等量の蒸留水にて抽出した。水層を陽イオン交換樹脂カラム (SP-トヨパール650 M, H⁺型) に通塔後、溶出液を凍結乾燥し、PEG (分子量5000) 1分子結合フラーレン (24.4 mg) を得た。

薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: 20%メタノール-ジクロロメタン) 相対移動度 (R_f) : 0.75.

【実施例2】

【0032】

分子量5000の代わりに分子量12000の片末端メトキシ基で片末端アミノ基のPEG (日本油脂製) を用い、実施例1と同様の操作をすることにより、PEG (分子量12000) 1分子結合フラーレン (47.4 mg) を得た。

薄層クロマトグラフィー (展開溶媒: 20%メタノール-ジクロロメタン) 相対移動度 (R_f) : 0.73.

【0033】

試験例1

実施例 1 において反応液を等量の蒸留水にて抽出した画分と、水層を陽イオン交換樹脂カラムに通塔後の画分を用いて分子量の測定を TSK gel G3000PW_xL (東ソー株式会社) を接続した高速液体クロマトグラフィシステム 8020 (東ソー株式会社) を用いて実施した。移動相として 20% アセトニトリル及び 0.3 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液, pH 6.9 を用い、移動相の流速を 0.5 mL/min とし、検出はフラーレンの紫外吸収で行った。その結果を図 1 に示す。分子量マーカーとしては、分子量が既知のポリエチレングリコール (分子量 94,000 及び 5,000) を用い、その保持時間を図 1 中に示した。

【0034】

比較対照として、特開平 9-235235 号の実施例 1 に従って、分子量 5000 の片末端メトキシ基で片末端アミノ基の PEG を用い、フラーレンと PEG のモル比が 1:10 の比率で合成したフラーレン-水溶性高分子結合体の分子量の測定を実施した。移動相として 0.3 M 塩化ナトリウムを含む 50 mM リン酸緩衝液, pH 6.9 を用い、移動相の流速を 1 mL/min とし、検出はフラーレンの紫外吸収で行った。その結果を図 2 に示す。分子量マーカーとしては、分子量が既知のポリエチレングリコール (分子量 94,000、46,000 及び 5,000) を用い、その保持時間を図 2 中に示した。

【0035】

これらの結果から、分子量約 5,800 の実施例 1 の化合物は自己組織化によって分子量約 100,000 の凝集体を形成し、そのサイズが大きくなっていることが示された。またその凝集体は、溶液組成が異なる状態においても再現良く形成され、結合する水溶性高分子の数が一定でそろっているために分子量分布の狭い、単一のピークを示した。一方、特開平 9-235235 号の実施例 1 に従って合成したフラーレン-水溶性高分子結合体は、主に分子量 46,000 以下に主要成分を有するが、その分子量分布が幅広く、複数のピークが見られたことから、水溶性高分子の結合数の制御が困難であることが示された。

【0036】

フラーレンに結合する置換基の結合数が、活性酸素の生成量に大きく影響することが知られており (文献: Toxicology in vitro, Vol.16, p41-46, 2002)、実施例 1 の化合物のように分子サイズが一定であることはドラッグデリバリーシステムのターゲッティング及び活性酸素の生成量の点からも、従来のフラーレン-水溶性高分子結合体と比較して有用であることが示された。

【0037】

試験例 2

本発明化合物について、光散乱法による粒径測定を行った。本発明化合物を蒸留水に最終濃度 1 mg/mL 及び 100 µg/mL になるように溶解した。この溶液を光散乱測定装置 DLS-7000 (大塚電子株式会社) で測定した。その測定結果を図 3 に示す。

【0038】

測定結果より、実施例 1 の化合物は比較的粒径がそろった約 50 nm の粒子径を、実施例 2 の化合物は若干粒径分布が広い約 100 nm の粒子径を、それぞれ有する凝集体であることが示された。これらの粒子径は、高分子物質が、正常組織に比べてがん組織に移行しやすく、またがん組織に長く滞留する傾向がある事を利用した EPR 効果 (Enhanced Permeation and Retention effect) を示すのに十分な大きさであると考えられる。

【0039】

試験例 3

チトクローム法により、活性酸素 (スーパーオキシドアニオン, O₂⁻) 発生量を測定した。最終濃度 50 µM になるようにチトクローム c (ナカライテスク社) をハンクス平衡塩溶液 (HBSS, pH 7.4、ライフテックオリエンタル社) に溶解した 200 µL と、実施例 2 で調製した PEG (分子量 12000) 1 分子結合フラーレンを最終濃度 200 µM になるように HBSS に溶解した 200 µL を混合した。この混合溶液に種々の波長の光 (220~800 nm) を分光蛍光光度計 F-2000 (日立製作所) を用いて

、30℃で20分間照射した。照射後、溶液の550 nmの吸光度を分光光度計DU-650（ベックマン社）で測定した。30℃で20分間遮光条件下の溶液をコントロールとし、1分間当りの O_2^- 発生量を図4に示した。

【0040】

実施例2の化合物は光の照射を行った場合、紫外～可視光領域の広い波長範囲で O_2^- が発生が観察され、特に260～450 nmの広い波長範囲で有意な発生が認められた。従って、光照射による癌の光線力学的治療に適用できる事が示された。また、超音波照射により惹起されたソノルミネッセンスによって発生する光は、主として300～600 nmの波長範囲を有するので、本化合物は超音波治療にも好適である事が示された。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】実施例1で得られたPEG1分子結合フラーレンを高速液体クロマトグラフィーに付して分子量を測定した結果を示す。

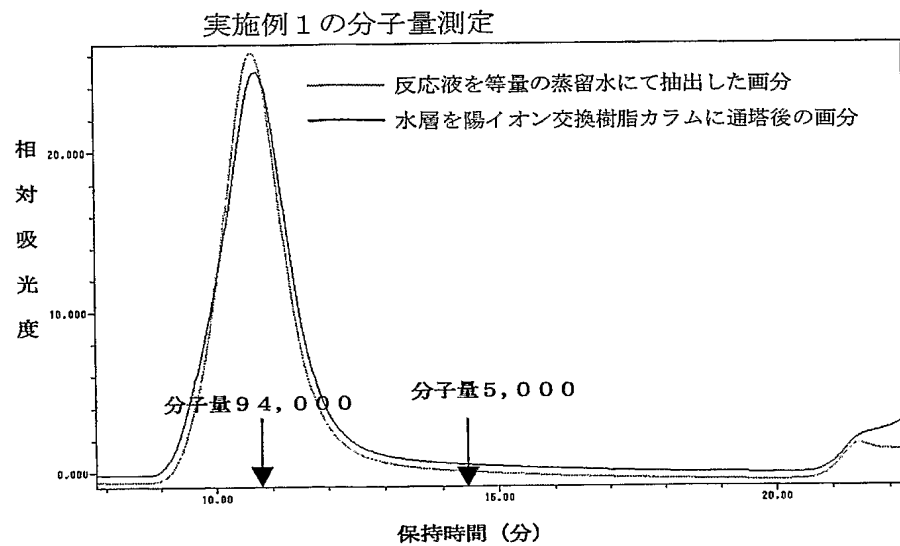
【図2】特開平9-23523号公報に記載された実施例1に従って合成したフラーレン-水溶性高分子結合体を高速液体クロマトグラフィーに付して分子量を測定した結果を示す。

【図3】実施例1および2で得られた本発明の水溶性フラーレンの粒子径を光散乱法により測定した結果を示す。

【図4】実施例2で得られた本発明の水溶性フラーレンの光照射による活性酸素発生量を測定した結果を示す。

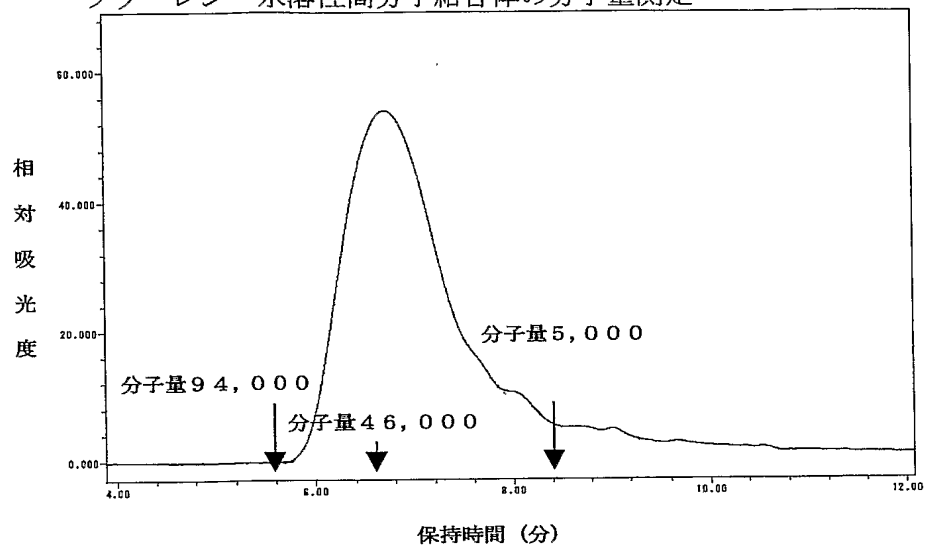
【書類名】 図面

【図 1】



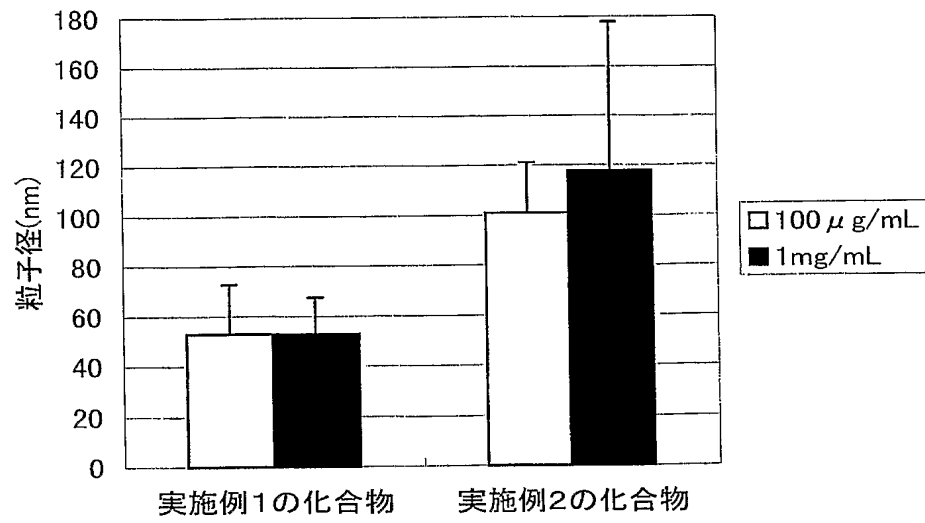
【図 2】

特開平 9-235235 号の実施例 1 に従って、合成した
フラーレン-水溶性高分子結合体の分子量測定

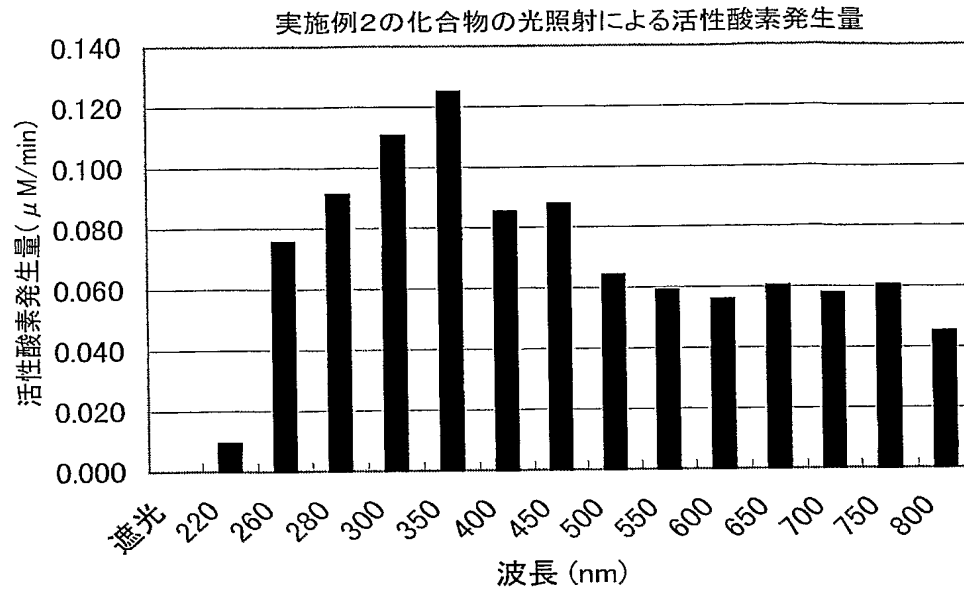


【図 3】

実施例1及び2の化合物の粒子径



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 修飾分子数が制御された高分子結合水溶性フラーレンの提供。

【解決手段】 分子中に官能基を有するフラーレンの官能基に水溶性高分子を結合させることにより、水溶性高分子の修飾分子数が制御された水溶性高分子結合フラーレンが得られ、この水溶性高分子結合フラーレンに光を照射すると、220 nm～可視光領域（380～780 nm）の広い波長範囲で O_2^- が発生し、光照射による癌の光線力学的治療に適用でき、また、超音波治療にも好適である。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 1 0 2 9 5 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 9 0 2 9 4 2 0]

1. 変更年月日

1 9 9 9 年 3 月 3 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府宇治市琵琶台 3 - 8 - 1 6

氏 名

田畑 泰彦

特願 2 0 0 4 - 1 0 2 9 5 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 4 0 8 6]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区富士見 1 丁目 1 1 番 2 号

氏 名

日本化薬株式会社